

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791943

研究課題名(和文) 難治性副鼻腔炎と下気道疾患の関連 - IL - 33 による粘膜組織内の相互作用について -

研究課題名(英文) An association between refractory rhinosinusitis and lower respiratory tract disease

研究代表者

和田 弘太 (Wada, Kota)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20307482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：採取した組織を用いてHE染色を行い好酸球浸潤の程度、上皮の正常を観察しIL-33に対する免疫染色を行った。アトピー型気管支喘息合併患者、非アトピー型気管支喘息合併患者、アスピリン喘息合併患者においては好酸球浸潤を強く認めた。IL-33の染色は上皮に染色される傾向があった。好酸球性副鼻腔炎患者において染色される傾向にあったが有意差は認めなかった。鼻ポリープから線維芽細胞を培養しAlternaria刺激にてIL-6の産生は認めた。しかし、線維芽細胞からのIL-33の産生は認めなかった。鼻副鼻腔粘膜由来上皮細胞を培養し、培養系を確立したがIL-33の産生の状態、遺伝子の発現については出来なかった。

研究成果の概要(英文)：We performed hematoxylin and eosin stain using the tissue which we obtained and observed degree of the eosinophil leukocytic infiltrate, an epithelial cells and performed immunostaining for IL -33. It showed eosinophil infiltrate in the atopic type bronchial asthma patients, the non-atopic type bronchial asthma patients, the patients with aspirin asthma strongly. The staining of IL -33 tended to be stained by epithelium. We tended to be stained in patients with eosinophilic rhinosinusitis, but the significant difference was absent. We cultured fibroblasts from a nasal polyp, and Alternaria stimulation showed the production of IL-6. However, the production of IL -33 from fibroblasts was absent. We cultured epithelial cells derived from nose and sinus mucosa and we established culture system, but were not able to do it about the state of the production of IL -33, the genetic expression.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：副鼻腔 好酸球 副鼻腔炎 好酸球性副鼻腔炎 IL-33 Alternaria

1. 研究開始当初の背景

慢性副鼻腔炎の治療法は、少量マクロライド療法と内視鏡を用いた手術療法で確立されつつある。しかし、慢性副鼻腔炎の中で、アレルギー素因、特に気管支喘息やアスピリン喘息など好酸球性の炎症疾患を有する患者は治療に抵抗し、難治性副鼻腔炎とされる。気管支喘息やアスピリン喘息も同様に、治療は確立されつつあるが、根本的な病因の解明には至っていない。そこで、我々は副鼻腔粘膜、鼻ポリープを用いて、これら難治性副鼻腔炎の原因を追究し、最終的には気管支喘息、アスピリン喘息の病因に迫りたいと考えている。

2. 研究の目的

欧米における副鼻腔炎のガイドライン¹⁾によると、副鼻腔炎は4カテゴリーに分類される。急性(細菌性)副鼻腔炎、ポリープを伴わない慢性副鼻腔炎、ポリープを伴う副鼻腔炎、アレルギー性真菌性副鼻腔炎である。副鼻腔炎の原因としては、鼻中隔弯曲症や副鼻腔自然口(osteomeatal complex)の閉塞など、解剖学的な内因的要因と、バイオフィームや骨炎といった難治性感染、黄色ブドウ球菌が産生するスーパー抗原、好酸球性炎症を誘発・維持する真菌のコ

ロニー形成などの外因的要素が挙げられる。しかし、気管支喘息合併副鼻腔炎患者やアスピリン喘息合併副鼻腔炎患者は明らかな解剖学的な異常や外的な要因は認めないにも関わらず、内服治療や手術療法に抵抗を示す。喘息と同様に、ステロイドには反応するが、根治的な治療はまだ解明されていない。これらの副鼻腔炎患者は高率に鼻茸を合併し、組織学的に副鼻腔粘膜において好酸球や肥満細胞の浸潤や、線維芽細胞や杯細胞の増生を認める。これらの疾患は欧米のガイドラインではポリープを伴う副鼻腔炎(Chronic rhinosinusitis with nasal polyp)に分類されるが、本邦では森山らによって好酸球性副鼻腔炎という概念が提唱されている²⁾。喘息などの下気道疾患を伴うことが多く末梢血好酸球増多を認め、副鼻腔粘膜内には活性化型好酸球を著明に浸潤し、にかわ状の粘稠性分泌物が大量に貯留している。このような副鼻腔炎は難治性副鼻腔炎とされ、気管支喘息やアスピリン喘息と同様に根本的な病因は不明である。米国の統計では副鼻腔炎の治療によって1年に56億ドルの直接的経済損失があるという報告があり、副鼻腔炎の発症原因と難治化因子を解明することは、治療成績という面だけでなく、医療経済の面からも大きい。

インターロイキン (IL) -33 は Schmitz らによって 2005 年に同定された、IL-1 ファミリー属するサイトカインであり、Th2 型の免疫応答を惹起する³⁾。IL-33 は上皮細胞や血管内皮細胞より産生され、肥満細胞、好酸球、マクロファージ、樹状細胞を標的として ST2/IL-1RAcP 受容体と結合して、NF- κ B 経路と MAP kinase 経路を活性化することで、アレルギー炎症の誘導に関与する IL-5 や IL-13 を産生し、自然型アレルギー炎症を引き起こす。私が所属した、Mayo Clinic から、ヒト好酸球が ST2 分子を発現し、IL-33 が好酸球の生存率を上昇させ、superoxide 誘導能、好酸球の脱顆粒を引き起こすことを報告している⁴⁾。また、IL-33 は PAMPs (pathogen associated molecular patterns) としてだけでなく、DAMPs (damage associated molecular patterns)、"Alarmin" として働くという報告もある。このように IL-33 はアレルギー疾患の発症と増悪に関与している可能性がある。TSLP (thymic stromal lymphopoietin) も近年同定されたサイトカインで、主にケラチノサイト、気道上皮細胞が産生し TSLPR-IL-7Ra を受容体として、主に myeloid Dendritic cells(DCs) に OX40 ligand を発現させ、炎症性 Th2 細胞を誘導し分化・増殖させる。IL-25

も近年、Th2 細胞が産生する IL-17 ファミリーとして同定された。上皮細胞や好酸球、肥満細胞も IL-25 を産生することが分かっている。IL-25 は IL17RB を受容体とし、アレルギー炎症の維持と増強に関与しているとされる。このように上皮は免疫機構において、重要なバリアの役割を担い、上皮-上皮下の細胞-炎症細胞の関係を調べることは病因を調べる上で、重要と考える。

真菌は気管支喘息の増悪因子の一つである。Mayo Clinic の Ponikau らは副鼻腔炎と真菌との関係を報告し、また Shin と Kita らは副鼻腔炎患者の末梢血単核球の真菌の刺激は正常被検者と比べサイトカイン産生が優位に上昇していることを示した。また、真菌、特に *Alternaria* は好酸球を活性化させ脱顆粒を引き起こすことを示し、私の実験でも、*Alternaria* は鼻茸由来線維芽細胞から IL-6 と IL-8 の産生を誘導することが判明している。最近、*Alternaria* の刺激で気道上皮細胞から IL-33 が分泌されることも発表された。今回、私は難治性副鼻腔炎患者と喘息患者は局所好酸球浸潤が多いこと、細菌やウイルス感染後に症状が増悪する事実に着目した。そこで真菌、特に *Alternaria Alternata* に注目し、*Alternaria* の免疫誘導能、サイトカイン産生を調べることで、副鼻腔炎、気管

支喘息の発症因子と難治化因子の解明を目的として研究を立案した。

3. 研究の方法

副鼻腔炎患者を

健常人（下垂体腫瘍、眼窩壁骨折患者）

喘息非合併患者

アトピー型気管支喘息合併患者

非アトピー型気管支喘息合併患者

アスピリン喘息合併患者の5群に分け検討を行う。

東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認のもと、研究を行った（25-096, 7231）。

患者から採取した鼻副鼻腔組織を用いた臨床研究を行う。

組織の免疫染色を行い IL-33 の局在、ST2 の局在を調べ、標的細胞を調べる。同時に鼻副鼻腔粘膜より上皮細胞を分離培養する。

Alternaria 刺激（他、poly I:C など）により IL-33 の産生を観察する。また、IL-33 と炎症性サイトカインをともに刺激を行いオートクラインの IL-33 の産生を測定する。

免疫染色

組織切片を作製して、IL-33、ST2 を染色する（染色の程度を観察し、凍結切片も検討する）。ST2 陽性細胞を検討し、活性化型好酸

球のマーカーである EG2、肥満細胞のマーカーとなる Mast Cell Tryptase で2重染色を行い、鼻副鼻腔炎における標的細胞を同定する。また、TSLP,IL-25 についても同様に検討する。

細胞培養、刺激方法

気道上皮細胞は、鼻副鼻腔粘膜から容易に培養が可能である。気道上皮細胞は前部篩骨洞粘膜（鉤状突起、篩骨胞）より培養する。得られた組織を骨組織より剥離し、細かく切り小片にする。これを型コラーゲンでコートされた培養皿で、Bronchial Epithelial Growth Medium を用いて培養する。線維芽細胞は鼻ポリープを小片にし、DMEM/F12 + 10% FBS にて培養を行う。

上皮バリア機構、自然免疫機構の検討するために上皮細胞に刺激を加え、粘膜下の反応について検討するために線維芽細胞を使用する。得られた細胞を、Alternaria Alternateなどで刺激を加える。刺激後、24 時間、48 時間後の培養上清を ELISA で IL-33 の産生量を検討する。TSLP,IL-25 についても ELISA を行う予定である。上皮細胞にも ST2 が発現していることが知られるようになった。IL-33 で刺激後、cytokine protein microarray を施行し、次の実験につながる発

現増強タンパク質を同定する。

4. 研究成果

それぞれの群から採取した組織を用いて H E 染色を行い好酸球浸潤の程度、上皮の正常を観察し IL-33 に対する免疫染色を行った。

いままで知られているようにアトピー型気管支喘息合併患者、非アトピー型気管支喘息合併患者、アスピリン喘息合併患者においては好酸球浸潤を強く認めた。EG2 陽性細胞の比率は、健常人、喘息非合併例と比べ高く染色された。上皮の形態は、維持されているもの、剥離、脱落などさまざまであった。

IL-33 の染色は上皮に染色される傾向があった。アトピー型気管支喘息合併患者、非アトピー型気管支喘息合併患者、アスピリン喘息合併患者において染色される傾向にあったが有意差は認めなかった。

鼻ポリープから線維芽細胞を培養し Alternaria で刺激を行うと、濃度依存的に IL-6 の産生は認めた。しかし、鼻ポリープ線維芽細胞からの IL-33 の産生は認めなかった。Alternaria は強いサイトカイン、ケモカイン産生能力を持ち、好酸球などに対して IL-8、GM-CSF の産生、好酸球の脱顆粒能を有する。今後は、double-stranded RNA poly (I:C) や DNA ウィルスモデルで刺激を行い、それで

も産生が認められない場合は IL-1 や TNF など共刺激し検討を行う。また、鉤状突起から鼻副鼻腔粘膜由来上皮細胞を培養し、培養系を確立したが IL-33 の産生の状態、遺伝子の発現については出来なかった。今後は、IL-33 の産生ないし貯蔵細胞である上皮細胞について十分な検討する必要があると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 弘太 (Wada Kota)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：20307482

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：